

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08040981 A**

(43) Date of publication of application: **13 . 02 . 96**

(51) Int. Cl. **C07C 69/587**
C11C 3/00
C11C 3/06
// A61K 31/23
A61K 31/23
A61K 31/23

(21) Application number: **07065496**

(22) Date of filing: **24 . 03 . 95**

(62) Division of application: **60086889**

(71) Applicant: **NISSUI PHARM CO LTD**

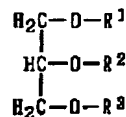
(72) Inventor: **TACHIBANA KUNIOMI**
KONDO SHIGEMI

(54) **EICOSAPENTAENOYL GLYCERIDE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new compound useful for treating and preventing various diseases derived from hyperlipemic serum, having excellent lowering action on lipid in serum and inhibitory action on blood platelet aggregation.

CONSTITUTION: This compound is expressed the formula (at least two of R^1 to R^3 are eicosapentaenoyl and the rest is H) such as trieicosapentaenoyl glyceride. The compound of the formula is obtained by halogenating eicosapentaenoic acid of the formula, $R-COOH$ (X is a halogen) to give an eicosapentaenoic acid halogenide of the formula, $R-COX$ (X is a halogen) and reacting the compound with glycerol. This new compound of the formula has low toxicity and excellent absorption by oral administration and is effective for treating preventing asthmatic attack, diabetes, arthritis, etc.



COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-40981

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 2 月 13 日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 69/587		9546-4H		
C 1 1 C 3/00				
3/06				
// A 6 1 K 31/23	A B X	9455-4C		
	A C B			

審査請求 有 発明の数 1 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-65496
(62) 分割の表示	特願昭60-86889の分割
(22) 出願日	昭和60年(1985) 4 月 23 日

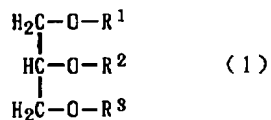
(71) 出願人	000226862
	日水製薬株式会社
	東京都豊島区巣鴨 2 丁目 11 番 1 号
(72) 発明者	橋 園臣
	埼玉県北葛飾郡栗橋町栗橋959-22
(72) 発明者	近藤 繁美
	埼玉県北埼玉郡騎西町大字外川54-63
(74) 代理人	弁理士 有賀 三幸 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 エイコサペンタエノイルグリセライド

(57) 【要約】

【構成】 次の一般式 (1)

【化 1】



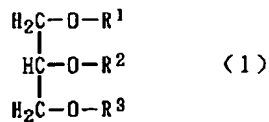
(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 の少なくとも 2 つはエイコサペンタエノイル基を示し、残余は水素原子を示す) で表わされるエイコサペンタエノイルグリセライド。

【効果】 本発明のエイコサペンタエノイルグリセライド (1) は、極めて毒性が低く、優れた血清中脂質低下作用、血小板凝集抑制作用を有し、高脂血清に由来する種々の疾病の治療及び予防に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の一般式(1)

【化1】



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 の少なくとも2つはエイコサペンタエノイル基を示し、残余は水素原子を示す)で表わされるエイコサペンタエノイルグリセライド。

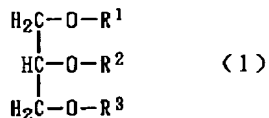
【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規なエイコサペンタエノイルグリセライド、更に詳細には、次の一般式(1)

【0002】

【化2】



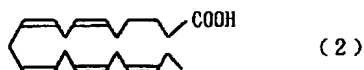
【0003】(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 の少なくとも2つはエイコサペンタエノイル基を示し、残余は水素原子を示す)で表わされるエイコサペンタエノイルグリセライドに関する。

【0004】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来、次式(2)で表わされるエイコサペンタエン酸(以下、「EPA」と称する)が人体における血漿コレステロールを低下させる作用を有し、血栓症の予防もしくは治療に使用できることが知られている。

【0005】

【化3】



【0006】また、EPAはサバ、イワシ、タラ等の水産物油脂中にグリセライドとして含有されているが、このグリセライドは1個のEPAと2個の他の脂肪酸とからなるトリグリセライドである。従って、天然の斯かるトリグリセライドを、EPAの有効量において投与すると、他の脂肪酸のために多量のカロリーを与える結果となり、栄養過多を惹起するという問題があった。

【0007】従って、斯かる欠点を克服するものとして、近年、2個のEPAと1個の他の脂肪酸とからなるトリグリセライドが提案された(特開昭59-190948号)。しかし、これも依然として1個の脂肪酸が存在し、上記問題点は完全には解決されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】斯かる実状において、本発明者は上記問題点を解決せんと鋭意研究を行った結

果、EPAのジグリセライド及びトリグリセライドが経口投与において、吸収性がよく、優れた脂質低下作用及び血小板凝集抑制作用を示すことを見出し、本発明を完成した。

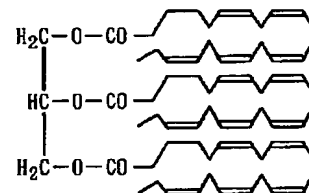
【0009】すなわち、本発明は上記一般式(1)で表わされるエイコサペンタエノイルグリセライド(以下「EPAG」と称する)を提供するものである。

【0010】本発明のEPAGとしては次のものが挙げられる。

10 【0011】トリエイコサペンタエノイルグリセライド [EPA-TG]

【0012】

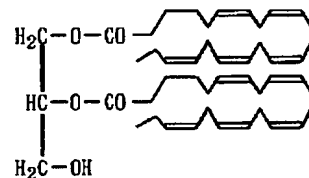
【化4】



20 【0013】1, 2-ジ(エイコサペンタエノイル)グリセライド [1, 2-EPA-DG]

【0014】

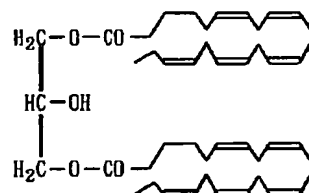
【化5】



30 【0015】1, 3-ジ(エイコサペンタエノイル)グリセライド [1, 3-EPA-DG]

【0016】

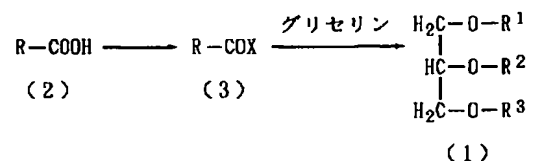
【化6】



40 【0017】本発明のEPAGは例えば、次の反応式に従ってEPA(2)をハロゲン化してEPA-ハロゲンイド(3)となし、これにグリセリンを反応させることにより製造される。

【0018】

【化7】



【0019】(Rはエイコサペンタエノイル基を、Xはハロゲン原子を示し、R¹, R², R³は前記の意味を有する)

【0020】原料のEPAは、例えば特開昭58-8037号に記載の方法によって得られたEPA-エチルエステルをエタノール中、苛性カリで分解することにより高純度のものとして得ることができる。EPAのハロゲン化は、自体公知の方法によって行うことができる。例えばハロゲン化剤としてオキザリルクロライドを使用し、65～90℃の温度で4時間反応を行えばEPA-クロライドが得られる。EPA-ハロゲンイド(3)とグリセリンとの反応は、クロロホルム等の溶媒中、キノリン、ピリジン等の塩基の存在下、数時間加熱還流することによって行われる。EPA-ハロゲンイドはグリセリンの3倍モル以上を使用する。このようにして得られる反応生成物は、EPA-TG、1, 2-EPA-DG及び1, 3-EPA-DGの混合物であるが、これは後述の実施例に示す如く、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりEPA-TGとEPA-DG(1, 2-体と1, 3-体の混合物)とに分けて収得することができる。そしてこれらの比は約1:1である。

【0021】EPA-TG及びEPA-DGの物性は表1のとおりである。

【0022】

【表1】

物 性	EPA-TG	EPA-DG
性 状	淡黄色澄明な油で、緩和で特異なにおいを有し、ほとんど無味	同 左
溶媒に対する溶解性	エーテル、クロロホルム、石油、ベンジンに可溶。エタノールにやや溶ける。	同 左
凝 固 点	-20℃で凝固しない	同 左
酸 価	6以下	同 左
赤外線吸収スペクトル	図 1	図 2

【0023】

【作用】次にEPA-TG及びEPA-DGの生物学的活性を示す。

【0024】実験1 急性毒性(マウス)

(1) 実験方法

体重25～30gの4週令の雌雄のSIC:ICR系マウスを1群10匹として、EPA-TG又はEPA-DGを経口(po)又は腹腔内投与(ip)し、投与後7*

* 日間観察し、その間の急性中毒症状及び致死効果の有無を調べた。

(2) 実験成績

経口投与：雌、雄ともにEPA-TG又はEPA-DG 25g/kg・po後7日間に死亡したものは1例もなく、急性中毒症状についても投与1日後に下痢が見られたが投与3日～4日後に正常に復し、それ以外の変化は見られなかった。

腹腔内投与：雌、雄ともにEPA-TG 10g/kg・ip後7日間に死亡したものは1例もなく、著明な急性中毒症状を発現したのも無かった。

(3) 結論

EPA-TG及びEPA-DGのマウスにおける致死量は雌、雄ともに経口投与(po)の場合、25g/kg以上であり、腹腔内投与(ip)の場合、10g/kg以上である。

【0025】実験2 血清中脂質低下作用(ラット)

(1) 実験方法

体重200g前後の雄のSD系ラットを1群7匹とし、EPA-TG 0.5g/kg又はEPA-DG 0.75g/kg、サフラワー油5.0g/kg、対照として精製水5.0g/kgをそれぞれ30日間、連日経口投与(po)したのち、採血し血清中の脂質濃度を測定した。血清中の脂質濃度は次の測定用試薬を使用し、自動分析装置(日立705)により測定した。

総コレステロール：コレステロール705「ニッスイ」(日水製薬)

リン脂質：リン脂質-705「ニッスイ」(日水製薬)

トリグリセライド：トリグリセライド-705「ニッスイ」(日水製薬)

遊離脂肪酸：NEFA-Cセット「ニッスイ」(日水製薬)

(2) 実験成績

表2に示した様に、EPA-TG 0.5g/kg及びEPA-DG 0.75g/kgのpoにより血清中の総コレステロール、リン脂質濃度は有意に低下した。一方サフラワー油5.0g/kgでは総コレステロール、リン脂質濃度に著明な変化は見られなかった。血清中トリグリセライド濃度はEPA-TG及びEPA-DG群、サフラワー油投与群とも変化なく、血清中遊離脂肪酸濃度はEPA-TG及びEPA-DG群、サフラワー油群とも対照群に比し減少傾向がみられた。

【0026】

【表2】

投与群 g/kg po	例数	総コレステロール mg/dl	リン脂質 mg/dl	トリグリセライド mg/dl	遊離脂肪酸 UEq/l
対照群 精製水5.0	7	45.6±11.8	72.4±13.4	43.7±12.5	875±187
EPA-TG 0.5	7	31.4±7.8*	58.1±8.6*	47.2±19.9	789±122
EPA-DG 0.75	7	34.3±4.7*	54.2±7.3*	42.6±9.2	802±109
サフラワー油 5.0	7	40.3±6.6	69.9±7.8	47.0±16.6	751±97

*: 対照群との間の有意差を示す (P<0.05)

【0027】実験3 高脂血動物における血清中脂質低下作用 (ラット)

(1) 実験方法

ウイスター系の雄性ラットを1群10匹とし、被検薬投与開始の2週間前より下に示す高コレステロール食を摂取させておきながら、被検薬を8週間、連日経口投与 (po) したのち採血し、血清中の総コレステロール濃度及び遊離コレステロール濃度を実験2と同様の方法で測定した。

【0028】

【表3】高コレステロール食の処方

ミルクカゼイン	18.0 (%)
ショ糖	61.0
セルロース	4.0 *

* 硬化植物油	10.0
ミネラル類	4.0
ビタミン類	2.0
コレステロール	0.5
コール酸ソーダ	0.5

【0029】(2) 実験成績

表4に示した様にEPA-TG 6mg/kg又はEPA-DG 10mg/kgのpoにより高コレステロール食摂取による血清中総コレステロール、遊離コレステロール濃度の上昇は著明に抑制された。また正常食群における血清中遊離コレステロール濃度もEPA-TG 60mg/kg又はEPA-DG 90mg/kgのpoにより低下した。

【0030】

【表4】

処 置		例数	総コレステロール mg/dl	遊離コレステロール mg/dl
食 餌	被検薬mg/kg/8週po			
正 常 食	精 製 水 2,000	10	75±3.2	7.1±1.7
正 常 食	EPA-TG 60	10	86±16	3.6±0.9*
正 常 食	EPA-DG 90	10	82±7.0	4.2±0.9*
高コレステロール食	精 製 水 2,000	10	555±64	93.1±13.9
高コレステロール食	EPA-TG 6.0	10	340±42**	52.8±6.4**
高コレステロール食	EPA-DG 10	10	382±76**	61.2±5.2**

*は正常食+精製水群と高コレステロール食+EPA-TG60又はEPA-DG90群との間の

**は高コレステロール食+精製水群と高コレステロール食+EPA-TG6.0 又はEPA-DG10群との間の有意差を示す (P<0.05)。

【0031】実験4 血小板凝集抑制作用 (ウサギ)

(1) 実験方法

体重2.0kg前後の健康な雄の家兎を1群4匹とし、コレステロール0.5%を添加した飼料 (オリエンタル製RC-4) により飼育した。EPA-TGは200mg/kg、EPA-DG 300mg/kgを4週間、連日経口投与 (po) した。4週間経過後耳静脈より採血し、血小板豊富血しょう (PRP) を作製し、理化電機製「アグリゴメーター」 (AUTORAM-21型) を用い、コラ※

※ーゲン1.25μg/mlによる血小板凝集能を測定した。

(2) 実験成績

表5及び図3のごとくEPA-TG又はEPA-DG投与群では無処置群に比し、血小板凝集能は著明に抑制された。

【0032】

【表5】

処 置		例 数	血小板凝集 (光透過率%)
食 餌	被検薬mg/kg/4週p.o.		
0.5%コレステロール 添加食	精製水 200 (対照群)	4	73±12.5
0.5%コレステロール 添加食	EPA-TG 200	4	27±21.3*
0.5%コレステロール 添加食	EPA-DG 300	4	34±17.2*

*: $P < 0.05$ で有意差を示す。

【0033】実験5 喘息発作の予防効果

(1) 実験方法

30才から55才の季節性の認められない男性喘息患者8例中5例にEPA-TG 0.9g/日を、残りの3例にEPA-DG 1.5g/日をソフトカプセルの形で連日経口投与し、喘息発作の発現に対する影響を調べた。

(2) 実験成績

EPA-TGの場合には、投与した患者5例中1例はEPA-TG投与開始の4ヶ月前よりプレドニン5mgを毎日内服していたが、EPA-TG投与開始後1ヶ月で喘息発作の発現回数が減少し始め、3ヶ月後にはプレドニンから離脱することができた。別な1例はEPA-TG投与開始3ヶ月近くなって発作回数の減少が著明となった。残りの3例はEPA-TG3ヶ月間連続投与後も喘息発作発現に対し変化がみられず投与を中止した。またEPA-DGの場合には、3例の患者中2例はEPA-TG投与開始1ヶ月後より喘息発作の発現回数が減少し、3ヶ月後にはほとんど発作が発現しなくなった。残りの1例は3ヶ月投与後も発作発現の減少傾向が見られなかったため、投与を中止した。これによりEPA-TG及びEPA-DGは喘息発作発現に対し著明な予防効果を有することが判明した。

【0034】実験6 実験的腎炎に対する予防効果

(ラット)

* (1) 実験方法

6週令の雄ドンリュウ系ラットを1群10匹とし、グラスockらの方法〔ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン (J. Exp. Med.) 127, 555 (1968)〕によりハイマン (Heymann) 腎炎を作製し、この腎炎発現に対するEPA-TG及びEPA-DGの予防効果を調べた。ドンリュウ系ラットの尿管の水不溶性画分20mg/個体を0.5mlのフロイドの完全アジュバントとともにラットの両側後肢の足蹠皮下に注射して感作し、感作翌日よりEPA-TG又はEPA-DG 100mg/kgを6週間連日経口投与し、尿たん白排出量の変動を調べた。対照群には精製水0.1ml/kgを被検薬と同様に投与した。尿たん白量は永松らの方法〔日薬理誌 81, 295 (1983)〕により測定した。

(2) 実験成績

表6に示した様にEPA-TG及びEPA-DG 100mg/kg投与により感作6週後及び8週後の尿たん白排出量は有意に抑制された。これによりEPA-TG及びEPA-DGは自己免疫複合体腎炎の進行に対し予防効果を有することが判明した。

【0035】

【表6】

処 置	例 数	尿たん白排出量 mg/日				
		感作前	感作2週後	感作4週後	感作6週後	感作8週後
感作+精製水 0.1ml/kg	10	42±5.6	84±11	156±27	213±38	280±65
感作+EPA-TG 100mg/kg	10	41±6.7	76±14	139±36	162±26*	191±47*
感作+EPA-DG 100mg/kg	10	38±8.1	86±14	147±31	182±16*	211±27*

*: $P < 0.05$ で有意差

【0036】実験7 実験的糖尿病に対する効果 (ラット)

(1) 実験方法

体重200g程度の雄のドンリュウ系ラットを1群5匹

とし、糖尿病発症グループにはpH4.5のクエン酸緩衝液に溶解したストレプトゾトシン30mg/kgを静注した。被検薬はストレプトゾトシン静注の24時間前、1時間前及び5時間後にそれぞれ経口投与した。ストレプ

トゾトシン静注の24時間後に静脈血を採血し、酵素法によるグルコース測定用試薬V-GLU-Cセット「ニッスイ」(日水製薬)を用い、自動分析装置(日立706型)により測定した。

(2) 実験成績

表7に示した様に、EPA-TG又はEPA-DG10*

処 置		例 数	ストレプトゾトシン 静注24時間後 の血糖値 (mg/dl)
ストレプトゾトシン	被 検 薬 (mg/kg p.o.)		
A 無	精製水 0.1	5	155±6
B 30mg/kg i.v.	精製水 0.1	5	309±13
C 30mg/kg i.v.	EPA-TG 10	5	285±16
D 30mg/kg i.v.	EPA-TG 100	5	192±13*
E 30mg/kg i.v.	EPA-DG 10	5	311±27
F 30mg/kg i.v.	EPA-DG 100	5	172±33

*: B群との間の有意差を示す(P<0.05) 血糖値は平均値±S.E.

【0038】実験8 アジュバント関節炎に対する効果(ラット)

(1) 実験方法

ドンリュウ系の雌の7週令のラットを1週間飼育したのち実験に使用した。フロインドの完全アジュバント0.06mlをラットの尾皮内に注射してアジュバント関節炎を惹起した。被検薬はアジュバント注射の前日より1日1回2日間経口投与した。関節炎症状の評価はアジュバント注射2及び3週間後に四肢及び両耳介について関節

* 0mg/kg経口投与によりストレプトゾトシン糖尿病は著明に抑制された。これによりEPA-TG及びEPA-DGはストレプトゾトシン糖尿病発症の予防ならびに進行抑制効果を有することが判明した。

【0037】

【表7】

※ 関節炎スコアにより実施した。

(2) 実験成績

表8に示した様にEPA-TG又はEPA-DG100mg/kg経口投与によりアジュバント注射2週間及び3週後の関節炎スコアは著明に抑制された。これによりEPA-TG及びEPA-DGはアジュバント関節炎の進行発症に対し予防効果を有することが判明した。

【0039】

【表8】

薬 物 mg/kg. p.o.	例 数	測定日	関節炎スコア 平均値±S.E.
対照群 精製水 0.1ml	7	14日後	10.4±1.7
		21日後	13.6±2.3
EPA-TG 100	7	14日後	6.4±2.0*
		21日後	7.2±1.6*
EPA-DG 100	7	14日後	6.2±2.1*
		21日後	8.1±3.2*

*: それぞれ対応する対照群との間の有意差を示す
(P<0.05)

【0040】

【発明の効果】以上の実験から明らかな如く、本発明のエイコサペンタエノイルグリセライド(1)は、極めて毒性が低く、優れた血清中脂質低下作用、血小板凝集抑制作用を有し、高脂血清に由来する種々の疾病の治療及び予防に有効である。

【0041】

【実施例】次に実施例を挙げて説明する。

【0042】実施例1

EPA-エチルエステル40g(0.121モル)及び10%KOHエタノール(KOHとして8.15g(0.145モル))を仕込み、N₂ガス導入下(150ml/分)、75~76.5℃で1時間還流した。反応物を室温まで冷却し、10%HCl水にてpH2とし、無機塩が析出するので水50mlを加えて溶かし、n-ヘキサン100ml及び50mlで2回抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下40℃で留去し、油状のEPA35.9g(収率98.1%)を得

た。

【0043】実施例2

EPA35.1g (0.116モル) にオキザリルクロライド29.5g (0.232モル) を N_2 ガス導入下室温で滴下した。次いで65~75℃で4時間反応させ、反応後過剰のオキザリルクロライドをエバポレーターで留去した。残留物を減圧下蒸留し、144℃/1mmHg~187℃/2mmHgの留分を集めEPA-クロライド18.78g (収率50.4%)を得た。

【0044】実施例3

グリセリン1.81g (0.0197モル)、キノリン10.8g (0.084モル) 及びクロロホルム80.1gを仕込み、これにEPA-クロライド18.0g (0.056モル) を徐々に滴下した。これを72~80℃で3.5時間還流した。反応液を冷却後、石油エーテル540ml中に注加し、0.5N-硫酸水溶液300*

* mlを撈拌下加えて10分間撈拌し、30分間静置した。

分液し、その上層に5%炭酸カリウム水溶液300mlを加え、分液した。上層に水300mlを加え分液し、更に上層に飽和食塩水100mlを加えて分液し、その上層を採取した。これを無水硫酸マグネシウムで乾燥後エバポレーターで石油エーテルを留去し、油状物15.15gを得た。シリカゲル500gを特級ベンゼンを用いてガラスカラムに充填し、これに上記油状物10gを特級ベンゼン100mlに溶かしたものを注加した。次いで同ベンゼン8Lを用いて溶出し、300mlずつの分画を採取した。この分画について、TLC (キーゼルゲル60F₂₅₄, 展開溶媒: ベンゼン、確認: I_2 ペーパー) により溶出物を確認し、同一溶出物を集め、減圧下溶媒を留去し、次の物質を得た。

【0045】

【表9】

溶出分画番号	回収量 (g)	回収率 (%)	Rf値*	性 状 (物質)
1~4	0.02	0.20		
5~7	4.01	40.84	0.59	淡黄色油状物 (EPA-TG)
8~26	5.00	50.92	0.38	淡黄色油状物 (EPA-DG)
27~28	0.08	0.81		
29~30	0.71	7.23	0.06	黄褐色油状物

【図面の簡単な説明】

【図1】EPA-TGの赤外線吸収スペクトルを示す図である。

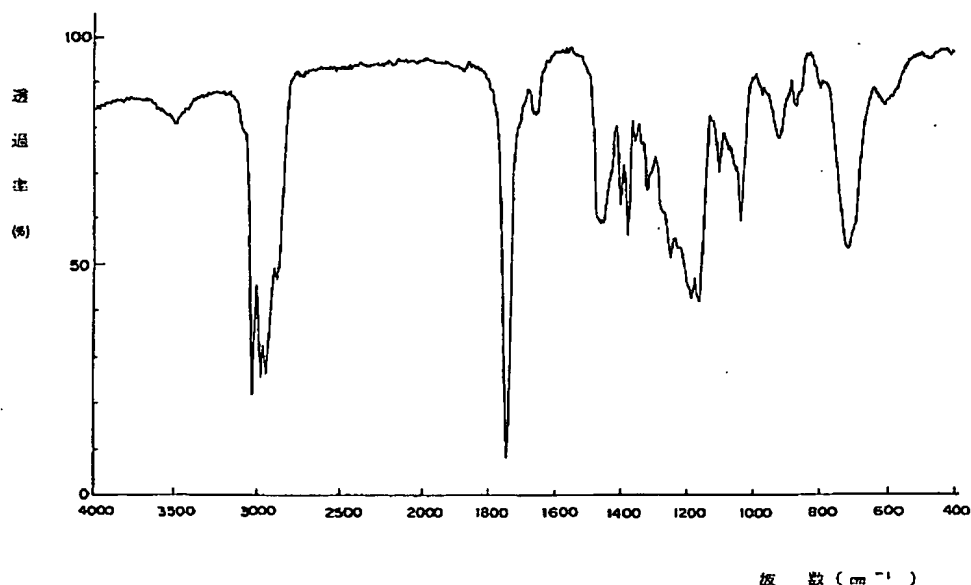
【図2】EPA-DGの赤外線吸収スペクトルを示す図※

※である。

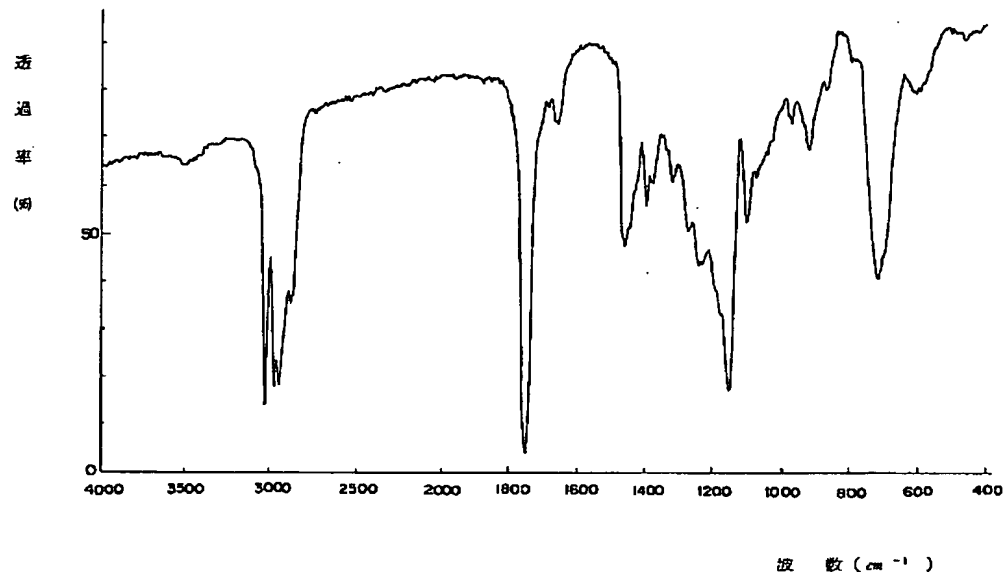
【図3】EPA-TG及びEPA-DGの血小板凝集抑制作用を示す図である。

30

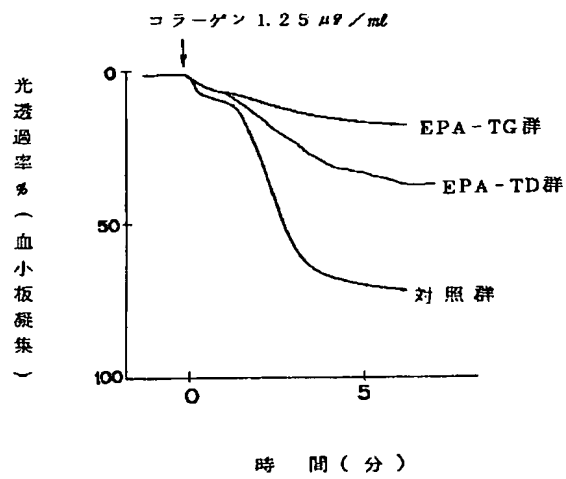
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶
A 61 K 31/23

識別記号
ADN

庁内整理番号

F I

技術表示箇所